

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 03-287064

(43)Date of publication of application : 17.12.1991

(51)Int.CI.

G01N 27/416  
G01N 27/327

(21)Application number : 02-088519

(71)Applicant : MATSUSHITA ELECTRIC IND CO LTD

(22)Date of filing : 03.04.1990

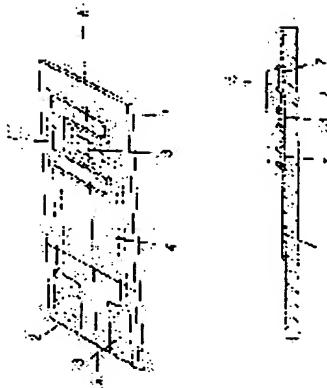
(72)Inventor : KAWAGURI MARIKO  
YOSHIOKA TOSHIHIKO  
NANKAI SHIRO

## (54) METHOD FOR MEASURING TRACE COMPONENT BY BIOSENSOR

## (57)Abstract:

**PURPOSE:** To shorten the time for measurement and to facilitate operations as well as to improve the accuracy of the measurement by dropping a sample liquid onto an enzyme reaction layer and measuring a flowing current while impressing a specified voltage between a measuring electrode and a counter electrode.

**CONSTITUTION:** The counter electrode 2 and the measuring electrode 3 are formed by printing carbon paste on a substrate 1 and heating and drying the paste. An insulating layer 4 is formed exclusive of a counter electrode reaction part 2' and a measuring electrode reaction part 3' to constitute the parts where the electrochemical effects of the respective electrodes act. The enzyme reaction layer 5 is so formed as to cover the surface of the reaction parts 3', 4'. The oxidizing current flows when an aq. glucose soln. is dropped to the reaction layer 5 while the prescribed constant voltage is impressed to the measuring electrode with the counter electrode as a reference. A correlation is obtd. between the peak value of the flowing oxidizing current and the glucose concn. The glucose concn. exhibits good linearity. Since the peak of the oxidizing current is obtd. within 5 seconds at the latest, the time for the measurement is drastically shortened.



## LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

⑯ 日本国特許庁 (JP)

⑯ 特許出願公開

⑯ 公開特許公報 (A)

平3-287064

⑤Int.Cl.<sup>5</sup>

G 01 N 27/416  
27/327

識別記号

庁内整理番号

④公開 平成3年(1991)12月17日

6923-2J G 01 N 27/46  
7235-2J 27/30 336 B  
353 R

審査請求 未請求 請求項の数 2 (全4頁)

⑤発明の名称 バイオセンサによる微量成分の測定方法

②特 願 平2-88519

②出 願 平2(1990)4月3日

⑦発明者 河栗 真理子 大阪府門真市大字門真1006番地 松下電器産業株式会社内  
⑦発明者 吉岡 俊彦 大阪府門真市大字門真1006番地 松下電器産業株式会社内  
⑦発明者 南海 史朗 大阪府門真市大字門真1006番地 松下電器産業株式会社内  
⑦出願人 松下電器産業株式会社 大阪府門真市大字門真1006番地  
⑦代理人 弁理士 栗野 重孝 外1名

明細書

1. 発明の名称

バイオセンサによる微量成分の測定方法

2. 特許請求の範囲

(1) 絶縁性の基板上に、測定極と対極とからなる電極系を設け、前記電極系の表面に酸化還元酵素と親水性高分子及び電子受容体からなる酵素反応層を設け、前記酵素と前記電子受容体と試料液との反応により生成する物質の濃度変化を電気化学的に前記電極系で検知して前記基質濃度を測定するバイオセンサにおいて、前記測定極と対極との間に一定電圧を印加しつつ前記酵素反応層上に試料液を滴下し、流れる電流を測定するバイオセンサによる微量成分の測定方法。

(2) 絶縁性の基板上に、測定極と対極とからなる電極系を設け、前記電極系の表面に酸化還元酵素と親水性高分子及び電子受容体からなる酵素反応層を設け、前記酵素と前記電子受容体と試料液との反応により生成する物質の濃度変化を電気化学的に前記電極系で検知して前記基質濃度を測定する

バイオセンサにおいて、前記測定極と対極との間に一定電圧を印加しつつ、前記酵素反応層上に試料液が滴下されたことを検知後一旦電圧の印加を止め、一定時間後に再度定電圧を印加し流れる電流を測定するバイオセンサによる微量成分の測定方法。

3. 発明の詳細を説明

産業上の利用分野

本発明は、バイオセンサを用いて生体試料中の微量の特定成分の酸化還元電流を電気化学的に測定することにより、特定成分を定量する方法に係る。

従来の技術

従来、血液などの生体試料中の特定成分について、試料液の希釈や攪拌などを行なうことなく簡単に定量できるセンサとして、第1図に示すようなバイオセンサが提案されている。このバイオセンサは、ポリエチレンテレフタレートからなる絶縁性の基板1に、スクリーン印刷により導電性カーボンペーストを印刷し、加熱乾燥することによ

特開平3-287064(2)

り、対極2、測定極3からなる電極系を形成する。つぎに、各々の電極の電気化学的に作用する部分となる対極反応部2'、1'の大きさの測定極反応部3'を残して上記電極系を覆うように絶縁性ペーストを印刷被覆し、加熱硬化処理をして絶縁層4を形成する。その後、対極反応部2'、3'を覆うように親水性高分子と酸化還元酵素と電子受容体とからなる酵素反応層5を形成したものである。このようにして形成された酵素反応層5へ試料液を滴下すると、酵素反応層5の中に含まれる酸化還元酵素と電子受容体が試料液に溶解し、試料液中の基質との間で酵素反応が進行し電子受容体が還元される。反応終了後、上記電極系2'、3'に電圧を印加することにより、酵素反応により還元された電子受容体が電気化学的に酸化され、このとき得られる最大酸化電流値から試料液中の基質濃度を求めていた。

#### 発明が解決しようとする課題

このような従来のバイオセンサでは、被測定物質と酵素とを予め反応させ、酵素反応の終了時

酸化して除去することが可能なため、測定の精度を向上させることが可能となった。

#### 実施例

以下、本発明の一実施例のバイオセンサであるグルコースセンサについて説明する。

##### (実施例1)

第1図および第2図は、グルコースセンサの構成について示したものである。ポリエチレンテレフタレートからなる絶縁性の基板1に、スクリーン印刷により導電性カーボンペーストを印刷し、加熱乾燥することにより、対極2、測定極3からなる電極系を形成する。つぎに、各々の電極の電気化学的に作用する部分となる対極反応部2'、1'の大きさの測定極反応部3'（1㎟）を残して導電性ペーストを焼付けて形成した電極系を覆うように絶縁性ペースト印刷し、加熱硬化処理をして絶縁層4を形成する。この対極反応部2'、3'の表面を覆うようにセルロース系の親水性高分子の一種であるカルボキシメチルセルロース（CMC）の0.5重量%水溶液を塗布乾燥し、

から測定を開始するので、測定結果が得られるまでに長時間を要するという問題があった。

本発明はこのような課題を解決するもので、短時間に正確に測定できるバイオセンサを提供することを目的とするものである。

#### 課題を解決するための手段

このような課題を解決するために本発明測定方法は、絶縁性の基板上の測定極と対極との間に酵素反応を設け酵素反応上に試料液を置き、酵素反応中の酵素および電子受容体と試料液との反応の結果生ずる物質の濃度変化を電気化学的に前記電極系で検知し、試料液中の基質濃度を測定する方法の乾燥状態にある酵素反応層上に定電圧を印加しつつ、試料液を滴下し、流れる電流を測定するものである。

#### 作用

本発明によれば、試料液の滴下開始時期が正確に検出でき、さらに、短時間に基質濃度の測定が可能となった。また、一度電圧を印加することにより、試料中に含まれている還元性の物質を電解

さらに、CMCの0.5重量%水溶液1gに酸化酵素としてグルコースオキシダーゼ（GOD）10mgと電子受容体のフェリシアン化カリウム20mgを溶かした溶液を滴下し、40℃で10分間乾燥して酵素反応層5を形成した。対極を基準にして測定極に+0.6Vの定電圧を印加しつつ、酵素反応層5にグルコース水溶液を滴下すると酸化電流が流れる。この電流は試料中のグルコースがグルコースオキシダーゼにより酸化される際フェリシアン化カリウムがフェロシアン化カリウムに還元され、このフェロシアン化カリウムが電極上で電解酸化されるために流れるものである。流れる酸化電流のピーク値とグルコース濃度の間に相関関係が得られ、グルコース濃度が600mg/dlまで良好な直線性を示した。印加電圧は+0.6Vに設定したが、電子受容体の還元体が酸化され、かつ水素発生などを伴わない電圧であればよい。酸化電流のピークは遅くとも5秒以内に得られるので、従来のバイオセンサで反応終了に1～2分必要としていた測定が、大幅に測定時間を短縮できた。

## 特開平3-287064(3)

なお、ピーク電流以外に、電流が最大になるまで流れた総電気量を測定した結果もグルコース濃度と相關しセンサへの試料の供給の仕方がバラついても総電気量の再現性は良好であった。

## (実施例2)

実施例1と同様にセンサを形成し、対極を基準にして測定極にアノード方向へ+0.5Vの定電圧を印加する。グルコース水溶液を滴下し、酸化電流の立ち上がりを検出後、電圧の印加をやめ、10秒後にもう一度+0.5Vの電圧を0.1秒印加し、酸化電流の最大値を測定した。さらに、50秒後、すなわち、測定開始から1分後に+0.5Vの電圧を同様に印加し5秒後の最大電流値を測定した。10秒後の最大電流値と1分後の最大電流値は両者ともグルコース濃度と相關があり、10秒後の応答は700mV/dl、1分後の応答は1000mV/dlの高濃度まで直線性があった。

実施例1の場合よりも直線性がのびたのは、フェリシアン化カリウムが溶解しながら反応しているため、5秒では高濃度のグルコースに対応する

このように、試料を滴下する前に電圧を印加しておくことにより、試料がいつセンサに供給されたかを検知でき、10秒間の待機時間も正確にできるため、スタート時を指示する必要もなく測定の精度が向上した。

なお、本発明のバイオセンサは上記実施例に示したグルコースセンサに限らず、アルコールセンサやコレステロールセンサなど、酸化還元酵素の関与する系に用いることができる。酸化還元酵素として、実施例では、グルコースオキシダーゼを用いたが、他の酵素、たとえばアルコールオキシダーゼ、コレステロールオキシダーゼ、キサンチノオキシダーゼなども用いることができる。また、電子受容体として、上記実施例に用いたフェリシアン化カリウムが安定に反応するので測定精度を高めるのに適しているが、P-ベンゾキノンを使えば、反応速度が大きいので高速化に適している。また、2, 6-ジクロロフェノールインドフェノール、メチレンブルー、フェナジンメトサルフェート、メチオナフタキノン4-スルホン酸カリウム、

フェリシアン化カリウムが供給できなかつたのを10秒待つことにより、より高濃度のフェリシアン化カリウムを供給できたためと考えられる。さらに、血液のような粘度の高い試料に対しては、酸化電流の立ち上がりがばらつき、実施例1の測定方法では再現性が悪かった。これは、酵素反応層の溶解速度が粘度の高い試料によりばらついたためと考えられる。しかし、実施例2のように10秒間測定を待つことにより、かなり再現性を向上させることができた。

10秒後のデータをそのままグルコース濃度に換算してもよいが、500mV/dl以上と検知した場合は、反応終了まで1分30秒必要ため、測定時間をのばすようにすると、より精度の高い測定が可能となる。さらに、試料中にアスコルビン酸のような還元性の物質が含まれている場合、電極上でフェロシアン化カリウムと同様酸化されて誤差の要因となるが、10秒後に一度電圧を印加して酸化することにより、1分後の測定への影響を除去することができる。

フェロセンなどが電子受容体として使用できる。

## 発明の効果

以上の実施例の説明からも明らかのように、本発明によれば、絶縁性の基板上に電極系を印刷し、酸化還元酵素と親水性高分子と電子受容体とからなる酵素反応層を形成したセンサにおいて、乾燥状態のセンサに定電圧を印加しつつ、試料液をセンサに供給したときに流れる電流を測定するもので、測定時間を10秒間と大幅に短縮できる。さらに、乾燥状態が電圧を印加しているため、試料の供給時を電流の立ち上がりで検知でき、正確に時間が検知できるため、測定の精度を高め、操作を簡易化できた。また、乾燥状態のセンサに電圧を印加しつつ試料液の供給時を検知後、一旦電圧の印加を止め再度電圧を印加して、流れる電流を測定することにより高濃度の試料や血液のような粘度の高い試料に対してても10秒で測定が可能となった。あるいは、10秒後の応答値をもとに、測定時間の調整をすることにより試料供給1分後の測定の精度を高めたり、試料中に存在して測定

特開平3-287064(4)

の際誤差要因となる還元性の物質を10秒後に電圧を印加して電解除去することも可能となった。

#### 4. 図面の簡単な説明

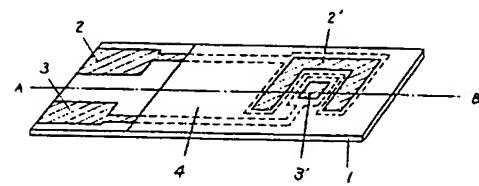
第1図は本発明の一実施例に用いるバイオセンサの斜視図、第2図は第1図のバイオセンサのA-B線縦断面図である。

1……基板、2……対極、2'……対極反応部、  
3……測定極、3'……測定極反応部、4……絶縁層、5……酵素反応層。

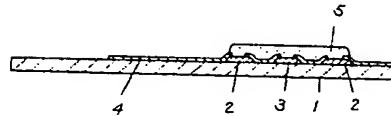
代理人の氏名弁理士栗野重幸ほか1名

第1図

- 1……基板
- 2……対極
- 2'……対極反応部
- 3……測定極
- 3'……測定極反応部
- 4……絶縁層
- 5……酵素反応層



第2図



【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載  
 【部門区分】第6部門第1区分  
 【発行日】平成6年(1994)6月24日

【公開番号】特開平3-287064  
 【公開日】平成3年(1991)12月17日  
 【年通号数】公開特許公報3-2871  
 【出願番号】特願平2-88519  
 【国際特許分類第5版】

G01N 27/416  
 27/327

【F1】

G01N 27/46 336 B 7235-2J  
 27/30 353 R 7235-2J

### 手続補正書

平成5年9月17日

特許庁長官殿

#### 1 事件の表示

平成2年特許願第88519号

#### 2 発明の名称

バイオセンサによる基質濃度の測定方法

#### 3 補正をする者

事件との関係 特許出願人  
 住所 大阪府門真市大字門真1006番地  
 名称 (582) 松下電器産業株式会社  
 代表者 森下洋一

#### 4 代理人

住所 大阪府門真市大字門真1006番地  
 松下電器産業株式会社内

氏名 (7242) 弁理士 小鈴治明  
 (ほか2名)  
 (通話先電話(03)5634-9471 知的財産権センター)

#### 5 補正の対象

発明の名称  
 明細書の特許請求の範囲の欄  
 明細書の発明の詳細な説明の欄

特許庁  
 5.9.20

#### 6、補正の内容

- (1) 発明の名称を「バイオセンサによる基質濃度の測定方法」に補正します。
- (2) 明細書の特許請求の範囲の欄を別紙の通り補正します。
- (3) 同第2ページ第10行目の「微量の特定成分の酸化還元電流を」を「特定成分(基質濃度)に対応した酸化還元電流を」に補正します。
- (4) 同第3ページ第16行目の「最大酸化電流値」を「酸化電流値」に補正します。
- (5) 同第4ページ第4行目の「バイオセンサ」を「基質濃度の測定方法」に補正します。
- (6) 同第4ページ第7行目から第15行目の「このようない……ものである。」を「このようない問題を解決するために本発明の測定方法は、絶縁性の基板上に測定極と対極とからなる電極系を設け、この電極系の表面に酸化還元酵素と親水性高分子及び電子受容体からなる酵素反応層を設け、この酵素と電子受容体と試料液との反応により生成する物質の濃度変化を電気化学的に

電極系で検知して基質濃度を測定するバイオセンサにおいて、測定極と対極との間に一定電圧を印加しつつ酵素反応層上に試料液を供給し、流れる電流を測定するものである。

さらには、一定電圧を印加しつつ前記酵素反応層上に試料液を供給し、次に前記試料液の供給を検知後一旦電圧の印加を止め、一定時間後に再度定電圧を印加し流れる電流を測定するものである。」に補正します。

(7) 同第4ページ第17行目の「試料液の滴下開始時期が」を「試料液の供給開始時期が」に補正します。

(8) 同第5ページ第4行目から第5行目の「以下、……説明する。」を「以下、本発明の基質濃度の測定方法の一実施例についてグルコースセンサをもとに説明する。」に補正します。

(9) 同第5ページ第8行目の「示したものである。」を「示したものである。第1図はセンサの斜視図、第2図は第1図のA-Bで示す線で切断したときの縦断面図である。」に補正しま

す。

(10) 同第5ページ第14行目から第16行目の「を残して置くように」を「を露出させるように」に補正します。

(11) 同第6ページ第12行目から第13行目の「流れる酸化電流のピーク値と～」を「この酸化電流、例えばピーク電流値と～」に補正します。

(12) 同第6ページ第17行目の「水素発生などを」を「ガス発生などを」に補正します。

(13) 同第7ページ第13行目の「最大電流値」を「電流値」に補正します。

(14) 同第8ページ第13行目の「場合は、反応終了まで1分30秒必要なため、」を「場合は、上記構成のグルコースセンサでは反応終了まで1分30秒程度必要なため、」に補正します。

(15) 同第8ページ第15行目の「が可能となる。」を「が可能となる。すなわち、高濃度であると判定(測定)した場合には測定時間を延長してから再度電圧を印加して測定することにより、

より精度の高い測定値を得ることができる」に補正します。

(16) 同第10ページ第10行目の「乾燥状態が」を「乾燥状態で」に補正します。

## 2、特許請求の範囲

(1) 絶縁性の基板上に、測定極と対極とからなる電極系を設け、前記電極系の表面に酸化還元酵素と親水性高分子及び電子受容体からなる酵素反応層を設け、前記酵素と前記電子受容体と試料液との反応により生成する物質の濃度変化を電気化学的に前記電極系で検知して前記基質濃度を測定するバイオセンサにおいて、前記測定極と対極との間に一定電圧を印加しつつ前記酵素反応層上に試料液を供給し、流れる電流を測定するバイオセンサによる基質濃度の測定方法。

(2) 絶縁性の基板上に、測定極と対極とからなる電極系を設け、前記電極系の表面に酸化還元酵素と親水性高分子及び電子受容体からなる酵素反応層を設け、前記酵素と前記電子受容体と試料液との反応により生成する物質の濃度変化を電気化学的に前記電極系で検知して前記基質濃度を測定するバイオセンサにおいて、前記測定極と対極との間に一定電圧を印加しつつ前記酵

該反応層上に試料液を供給し、次に前記試料液の供給を終了後一旦電圧の印加を止め、一定時間後に再度定電圧を印加し流れる電流を測定するバイオセンサによる基質濃度の測定方法。

（3）

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**